

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

BERICHTIGTE FASSUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. Oktober 2002 (10.10.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/078721 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 35/12**, C12N 5/08, 5/10

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/03640

(22) Internationales Anmeldedatum: 2. April 2002 (02.04.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 16 362.2 2. April 2001 (02.04.2001) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **BIO TISSUE TECHNOLOGIES AG [DE/DE]**; Bismarckallee 9, 79098 Freiburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **HARTMANN, Anke [DE/DE]**; Straubmühlweg II/413, 97078 Würzburg (DE). **FRIEDL, Peter [DE/DE]**; Helmuth-Zimmerer-Strasse 19, 97076 Würzburg (DE).

(74) Anwalt: **RICKER, Mathias**; Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, Galileiplatz 1, 81679 München (DE).(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: TWO-CONSTITUENT COMPOSITIONS FOR THE *IN SITU* PRODUCTION OF CELL TRANSPLANTS THAT COMPRISE FIBROBLASTS AND KERATINOCTYES(54) Bezeichnung: ZWEI-KOMPONENTEN ZUSAMMENSETZUNGEN ZUR *IN SITU* HERSTELLUNG VON FIBROBLASTEN UND KERATINOZYTEN UMFASSENDEN ZELLTRANSPLANTATEN

(57) Abstract: The invention concerns areas involving eukaryotic cell culture and tissue engineering, particularly fibrin-containing keratinocyte suspensions and fibroblast suspensions based on two constituents. The invention also relates to the use of the inventive keratinocyte suspensions and fibroblast suspensions for the *in situ* production of autologous (cell) transplants. The invention particularly relates to the use of transplants for treating patients with chronic ulcers of different origins, with burn wounds, post-traumatic wound defects, and for covering defects of extensive, benign, naevoid skin changes and of scars after prior dermabrasion. The invention also relates to the use of the inventive keratinocyte suspensions and fibroblast suspensions for treating postoperative wound defects after dermabrasion, excision or laser ablation of skin defects. The invention additionally relates to the accordingly produced transplants themselves, which contain keratinocytes or fibroblasts, to methods for producing the two-constituent keratinocyte composition or fibroblast composition, and to methods for producing collagen-free two-constituent compositions.

A1

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Gebiete der eukaryotischen Zellkultur und des Tissue-Engineering, insbesondere fibrinhaltige Keratinozyten- und Fibroblastensuspensionen auf Zwei-Komponentenbasis. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Keratinozyten- und Fibroblastensuspension zu *in situ* Herstellung autologer (Zell-)Transplantate; insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung der Transplantate zur Behandlung von Patienten mit chronischen Ulzera unterschiedlicher Genese, Verbrennungswunden, posttraumatischen Wunddefekten, sowie zur Defektdeckung ausgedehnter gutartiger nävoide Hautveränderungen Narben nach vorheriger Dermabrasion. Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Keratinozyten- und Fibroblastensuspensionen zur Behandlung von postoperativen Wunddefekten nach Dermabrasion, Exzision oder Laserablation von Hautdefekten. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die dem gemäß hergestellten Keratinozyten- bzw. Fibroblasten umfassenden Transplantate selbst, sowie Verfahren zur Herstellung der Zwei-Komponenten Keratinozyten- bzw. Fibroblastenzusammensetzung, sowie Verfahren zur Herstellung von kollagenfreien Zwei-Komponenten Zusammensetzungen.

WO 02/078721 A1



(48) Datum der Veröffentlichung dieser berichtigten

Fassung:

13. Februar 2003

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(15) Informationen zur Berichtigung:

siehe PCT Gazette Nr. 07/2003 vom 13. Februar 2003,
Section II

**Zwei-Komponenten Zusammensetzungen zur *in situ* Herstellung
von Fibroblasten und Keratinozyten umfassenden Zelltransplantaten**

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Gebiete der eukaryotischen Zellkultur und des Tissue-Engineering. Die Erfindung betrifft insbesondere fibrinhaltige Keratinozyten- und Fibroblastensuspensionen auf Zwei-Komponentenbasis. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Keratinozyten- und Fibroblastensuspensionen zur *in situ* Herstellung autologer (Zell-)Transplantate; insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung der Transplantate zur Behandlung von Patienten mit chronischen Ulzera unterschiedlicher Genese (venös, arteriell, diabetisch, neuropathisch), Verbrennungswunden, posttraumatische Wunddefekten, sowie zur Defektdeckung ausgedehnter gutartiger nävoider Hautveränderungen (epidermale Nävi, Návus papillomatous et pilosus) und Narben (hypertrophe Narben und Keloide) nach vorheriger Dermabrasion. Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Keratinozyten- und Fibroblastensuspensionen zur Behandlung von postoperativen Wunddefekten nach Dermabrasion, Exzision oder Laserablation von Hautdefekten. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die demgemäß hergestellten Keratinozyten- bzw. Fibroblasten umfassenden Transplantate selbst. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Herstellung der fibrin- bzw. fibrinogenhaltigen Zwei-Komponenten Keratinozyten- bzw. Fibroblastenzusammensetzung, sowie Verfahren zur Herstellung einer kollagenfreien Zwei-Komponenten Zusammensetzung.

Der medizinisch-biotechnologische Forschungs- und Anwendungsbereich des *Tissue Engineering* stellt eine in den letzten Jahren immer intensiver genutzte 30 Möglichkeit dar, verletzte bzw. fehlende Gewebestrukturen bzw. Organe durch

- 2 -

biotechnologisch hergestellte Transplantate zu ersetzen. In diesem Zusammenhang liegt ein Schwerpunkt auf der Herstellung und Transplantation sogenannter autologer Transplantate. Das Prinzip dieser Transplantationstechnik besteht darin, dass einem Patienten Zellen des gewünschten Typs (z.B. Keratinozyten) aus einer 5 intakten Gewebebereich (Spenderareal) entnommen, anschließend *in vitro* kultiviert ("expandiert") und eventuell auf einen Träger aufgebracht und schließlich in das Empfängerareal des Patienten transplantiert werden.

Prinzipiell sind jedoch autologe Transplantate aus einer Vielzahl von Zelltypen 10 herstellbar, beispielsweise aus Haut-, Knochen-, Knorpel- und Bindegewebe, sowie weiteren Gewebetypen.

Weiterhin existieren dermatologische Indikationsgebiete, die häufig die Transplantation von großflächigen Hautarealen erfordern. Hierbei sind als wichtigste 15 Indikationen insbesondere Brandverletzungen, posttraumatische Wunddefekte, nävoide Hautveränderungen, Narben und Keloide, sowie die aufgrund der erhöhten Lebenserwartung der Bevölkerung zunehmend an Bedeutung gewinnenden chronischen Ulzera unterschiedlicher Genese zu nennen.

20 Die bisherigen Therapiemaßnahmen bei der Transplantation von Haut basieren im wesentlichen auf den im folgenden vorgestellten Transplantationsmaterialien bzw. Verfahren.

Zur Therapie von Verbrennungen wurden von O'Connor und Mulliken (*Lancet*, 25 1981, Vol. 10, Seiten 75-78) kultivierte Keratinozyten als mehrschichtige Epidermis (sog. Cultured epidermal autografts = CEA) erstmals 1981 erfolgreich angewandt. Als epidermaler mehrschichtiger Hautersatz für Patienten mit lebensbedrohlichen Verbrennungen ist seit 1987 Epicel™ der Fa. Genzyme in USA, Kanada, Deutschland, Frankreich und Japan arzneimittelrechtlich zugelassen. Die 30 mögliche Verwendung einer präformierten mehrschichtigen Epidermis wird jedoch durch eine lange Kulturdauer von ca. 4-5 Wochen vor Transplantation ein-

geschränkt, wobei zugleich die zu erzielende mögliche maximale Deckungsfläche (2 cm² Biopsie entsprechen ca. 30 cm² Transplantatfläche) begrenzt ist. Die dünnen und mechanisch empfindlichen Transplantate stellen hohe Anforderungen an den Operateur und erfordern einen gut vorbereiteten Wundgrund. Außerdem sind 5 die Zellen bereits differenziert und daher nur noch eingeschränkt proliferationsfähig. Dies führt häufig zu mechanisch instabilen Regeneraten und der Notwendigkeit wiederholter Retransplantationen (Cooper, 1993). Die in diesem Verfahren auch verwendeten autologen Keratinozyten, die aus 50- 100 Haarwurzeln (Epigraft, Fa. BioCare GmbH, Leipzig) gewonnen werden können, sind erst nach 6 10 Wochen in Form von Zellpellets verfügbar, welche jedoch keine vollständige Wundabdeckung erreichen.

Weitere aus dem Stand der Technik bekannte Transplantate stellen sogenannte Keratinozyten-Fibrinmatrix-Konstrukte dar. Die Verwendung subkonfluent kultivierter Keratinozyten erfolgt durch die Kombination bzw. Mischung proliferativ aktiver Zellsuspension mit einer Fibrinsuspension. Das Zell-Fibringemisch wird im Wundbett vorübergehend fixiert, so dass die Keratinozyten im Wundbett migrieren, proliferieren, sich im dreidimensionalen Fibrinnetz ausrichten und unter Umbau der Fibrinmatrix eine mehrschichtige Epidermis *in situ* rekonstituieren 15 20 25 30 können. Die erste klinische Anwendung autologer Keratinozyten als Zellsuspension in Fibrin erfolgte 1988 durch Hunyadi *et al.* (*J. Dermatol. Surg. Oncol.*, 1988, Vol. 14, Seiten 75-78). Bei 16 von 20 Patienten mit Ulcera bis 25 cm² konnte eine vollständige Reepithelisierung nach nur 2 Wochen erreicht werden. Seit 1993 wird die Keratinozyten-Fibrin-Glue-Suspension (KFGS) in der Chirurgischen Universitätsklinik Freiburg, Abteilung Plastische und Handchirurgie, vornehmlich bei großflächigen Brandverletzungen (s. auch Stark *et al.*, *Eur. J. Plast. Surg.*, 1995, Vol. 18, Seiten 267-271) angewandt. Im Mausmodell zeigten KFGS-Transplantate im Vergleich zu präformierten mehrschichtigen Transplantaten (CEA, s.o.) postoperativ eine höhere mittlere Epidermisdicke und eine intakte Basalmembran mit Expression von Kollagen Typ VII, welches in der CEA-Gruppe fehlte (Horch *et al.*, *Cell Transplant.*, 1998, Vol. 7, Seiten 309-317). Au-

- 4 -

Bei dem waren bei Verbrennungspatienten, wenn CEA zur Anwendung kam, im Vergleich zur KFGS-Transplantation häufigere Retransplantationen notwendig (Stark *et al.*, *Eur. J. Plast. Surg.*, 1995, Vol. 18, Seiten 267-271).

5 Des Weiteren wurden zur Transplantation dermo-epidermale Allotransplantate verwendet, d.h. Transplantate, bei denen allogene Spenderzellen in einer allogenistischen oder xenogenen Stützmatrix verwendet werden. In der EU ist seit 1994 als dermales Allotransplantat bislang AlloDerm® der Fa. LifeCell Corporation zugelassen, welches aus de-epidermisierter und dezellularisierter Spenderhaut
10 Verstorbener besteht (Wainwright *et al.*, *J. Burn Care Rehabil.*, 1996, Vol. 17, Seiten 124-136). Weiterhin ist das Produkt TransCyte® erhältlich, welches aus Vorhautfibroblasten in einem nicht resorbierbaren 3D-Nylongitter besteht und der temporären Defektdeckung dient, sowie Dermagraft®, bei welchem statt Nylon ein resorbierbares Vicrylgitter verwendet wird. Als erstes und bislang einziges
15 zweischichtiges Komposithaut-Transplantat ist Apligraf® (Graftskin) der Fa. Organogenesis/ Novartis Pharma AG seit Mai 1998 in USA, Canada und in der Schweiz zugelassen. Hierbei werden *in vitro* Vorhautfibroblasten in Suspension mit bovinem Typ I Kollagen polymerisiert. Anschliessend werden auf die kontrahierte Kollagenmatrix allogene Keratinozyten (aus Vorhäuten Neugeborener) ausgesät, die schliesslich durch entsprechende Kulturbedingungen bereits *in vitro* eine vollständig differenzierte und verhorrende Epidermisoberfläche bilden
20 (Muhart *et al.*, *Lancet*, 1997, Vol. 350, Seite 1142).

Allerdings ergeben sich trotz der mit den oben dargestellten Verfahren erzielten
25 Erfolge eine Reihe von bislang ungelösten Schwierigkeiten bzw. Nachteilen. Präformierte mehrschichtige epidermale Transplantate sind, da sie bereits differenziert sind, nur noch eingeschränkt proliferationsfähig und mechanisch instabil (s. z.B. CEA).

30 Allotransplantate (aus homologen Spenderzellen) weisen zum einen das Problem eines gewissen Infektionsrisikos auf. Weiterhin wird üblicherweise bei der Kulti-

vierung der zu transplantierender Zellen fetales Kälberserum (FCS) sowie als Matrix bovines Kollagen verwendet, wobei ein gewisses Infektionsrisiko mit BSE nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft nicht völlig ausgeschlossen werden kann. Die im Stand der Technik üblichen Dermisäquivalente weisen weiterhin eine präformierte Kollagenstruktur auf, die sich dem Wundareal häufig nicht optimal mechanisch und physiologisch anpassen kann, so daß kosmetisch unbefriedigende Transplantationsergebnisse erhalten werden oder sogar eine Abstoßung des Transplantates stattfindet. Außerdem ergibt sich aufgrund der Dicke der extrazellulären Matrix, insbesondere bei alloplastischen Materialien (z.B. bei 3 D-Silikon-, -Nylon-, -Vicrylgittern), aber auch bei Kollagen-Gittern, eine Beeinträchtigung der Diffusionsstrecke von Nährlösungen bzw. Nährstoffen und damit der initialen Versorgung der Keratinozyten nach der Transplantation mit dem Risiko von Nekrosen. Dies ist vor allem auf eine mangelhafte bzw. gestörte dermoepidermale Interaktion zurückzuführen, die die Neubildung bzw. Proliferation verschiedener Zelltypen (Fibroblasten und Keratinozyten) erfordert. Letztendlich führen diese Probleme zu einer verminderten mechanischen Stabilität des präformierten Transplantates und damit zu einem höheren Risiko einer mißlungenen Transplantation.

Demzufolge ist es bisher nicht gelungen, ein Hauttransplantat zu entwickeln, das mechanische Festigkeit mit einer optimalen physiologischen und mechanischen Anpassung an das Wundareal bei gleichzeitig geringem Infektionsrisiko verbindet und das in akuten Fällen innerhalb kurzer Zeiträume zur Verfügung steht. Ferner existiert im Stand der Technik bis jetzt kein Transplantat, das auch in der Lage ist, bei profunden Verletzungen auch tiefere Wunden mit Granulationsgewebe auszufüllen, was dazu führt, daß bei tieferen Wunden zunächst die "natürliche" Ausfüllung der Wunde mit körpereigenem Granulationsgewebe abgewartet werden muß, bevor z.B. eine Keratinozytensuspension zur Abdeckung des Oberflächenareals aufgebracht werden kann. Weiterhin enthalten die bisher verwendeten Transplantate des Standes der Technik Kollagen, was dazu führt, daß die Synthese

von Kollagen und physiologischem Granulationsgewebe in der Wunde gehemmt bzw. erschwert wird.

Folglich bestand eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung in der Schaffung eines
5 Transplantatsystems, das ein geringes Infektionsrisiko für den Patienten darstellt. Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand darin, ein Transplantat-
system bereitzustellen, das eine optimale physiologische und mechanische Anpas-
sung des Transplantates an das Wundareal erlaubt, wobei neben oberflächlichen
Wunden insbesondere erstmals die Behandlung von profunden Wunden unter
10 Verwendung von fibrin- bzw. fibrinogenhaltigen Suspensionen autologer Zellen
(Fibroblasten und Keratinozyten) ermöglicht werden sollte. Schließlich bestand
eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung in der Bereitstellung von kolla-
genfreien Zellsuspensionen (Keratinozyten und Fibroblasten) zur Verwendung als
autologe Transplantate.

15

Demgemäß betrifft die vorliegende Erfindung eine Zwei-Komponenten Zusam-
mensetzung zur Behandlung von Hautdefekten, Ulzera, und Wunden umfassend
die folgenden Bestandteile:

- 20 a) Eine Fibroblastensuspension enthaltend Fibrin bzw. Fibrinogen als
Matrix (Komponente a); und
- b) eine Keratinozytensuspension enthaltend Fibrin bzw. Fibrinogen
als Matrix (Komponente b).

Die Zwei-Komponenten Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung ist
25 insbesondere dadurch charakterisiert, dass kein präformiertes Transplantat ver-
wendet wird, wie z.B. bei der CEA-Transplantation, sondern dass ein System be-
stehend aus den zwei Suspensionen (Komponenten) a) und b) zur Wundheilung
eingesetzt wird. Dies hat gegenüber den vorgeformten Transplantaten auf der Ba-
sis von konfluent kultivierten Zellen entscheidende Vorteile. So bewirkt die erfin-
30 dungsgemäß verwendete Zusammensetzung aus Fibroblasten und Keratinozyten,

dass *in situ* eine verbesserte dermo-epidermale Interaktion auftritt. Für die mechanische Stabilität einer dermo-epidermalen Junktionszone ist die Ausbildung einer kontinuierlichen, nicht fragmentierten Lamina densa sowie die Bildung von Verankerungsfilamenten ("anchoring fibrils") von besonderer Bedeutung. Durch die mit der erfindungsgemäßen Zwei-Komponenten Zusammensetzung erreichte Koinkubation von Keratinozyten mit Fibroblasten *in situ* wird die Entwicklung nativer extrazellulärer Matrixstrukturen ermöglicht. Das Prinzip der Synthese einer dermo-epidermalen Junktionszone im Sinne eines physiologischen Basalmembran-Äquivalents durch die Zellen selbst wird daher durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung realisiert. Des Weiteren bietet die erfindungsgemäße Zwei-Komponenten Zusammensetzung den Vorteil, daß die bei präformierten Transplantaten des Standes der Technik auftretenden mechanischen Probleme bei der Transplantation, wie z.B. Zerreissen oder Verkleben des Transplantates, nicht auftreten können. Die für die Zellen gemäß (a) und (b) verwendeten Suspensionskulturen werden vorzugsweise unter Reinraumbedingungen nach GMP-Standards hergestellt. Für den gesamten Herstellungsprozeß der erfindungsgemäßen Zusammensetzung sind Bedingungen der Reinheitsklasse A gemäß GMP-Standard bevorzugt, d.h., es dürfen nicht mehr als 3500 Partikel, die mindestens 0,5 µm groß sind und 0 Partikel, die mindestens 5 µm groß sind, pro Kubikmeter Luft vorhanden sein (bezügl. der Anforderungen an bestimmte Reinheitsklassen siehe "EG-Leitfaden einer guten Herstellungspraxis für Arzneimittel - mit Betriebsverordnung für pharmazeutische Unternehmer" (1998), 5. Auflage, Hrsg.: G. Auterhoff; Editio Cantor Verlag, Aulendorf). Die weiteren Verfahrensschritte zur Herstellung von Suspensionskulturen sind dem Fachmann bekannt. Die Bestandteile des Zwei-Komponenten Systems bestehend aus (a) und (b) umfassen neben den suspendierten Fibroblasten bzw. Keratinozyten in einer bevorzugten Ausführungsform jeweils Thrombin und Calciumchlorid, das durch vorzugsweise simultane Zugabe von Fibrinogen beim Auftragen in die Wunde (z.B. mittels einer Zwillingsspritze) zu Fibrin reagiert und die Auspolymerisation der Matrix in der Wunde bewirkt. Dabei kann in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die Zelllösung von Anfang an als Mischung mit

Fibrinogenlösung vorliegen und bei der Applikation in das Empfängerareal durch Thrombin/Calciumchloridzugabe aktiviert werden. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform findet die Mischung der Fibrinogenlösung zu der Zellsuspension (die in diesem Fall bereits Thrombin und Calciumchlorid enthält) erst 5 beim Aufbringen auf das Wundareal mittels Zwillingspritze statt. Demzufolge umfasst die vorliegende Erfindung auch Zwei-Komponentenzusammensetzungen die die erfindungsgemäße Zusammensetzung erst unmittelbar vor dem Einbringen in das Empfängerareal aufweisen, d.h. es sind auch solche Zusammensetzungen umfasst, bei denen die Fibrinmatrix und die Keratinozyten bzw. Fibroblasten- 10 suspensionen erst unmittelbar vor bzw. bei der Anwendung vereinigt werden.

Vorteilhafte Thrombinkonzentrationen liegen im Bereich von 50 bis 1000 i.E. Thrombin/ml, bevorzugt ist eine Konzentration von 200 bis 800 i.E./ml Lösung, besonders bevorzugt sind 500 i.E. Thrombin/ml. Vorteilhafte Calciumchloridkonzentrationen liegen im Bereich von 0,1 bis 50 mg/ml, bevorzugt ist 1 bis 10 15 mg/ml, besonders bevorzugt 5,88 mg/ml Calciumchlorid (alle Angaben stellen Endkonzentrationen dar). Eine ausführliche Darstellung von Fibrinklebern als biologische Zwei-Komponenten Systeme sowie deren Anwendung und Handhabung findet sich in EP 0 373 044, auf die hiermit in vollem Umfang Bezug genommen wird. Die verwendeten Kulturmedien sind auf den klinischen Einsatz am 20 Menschen ausgerichtet.

Eine vorteilhafte Zelldichte der erfindungsgemäßen Zwei-Komponentenzusammensetzung beträgt sowohl für Bestandteil (a) als auch für 25 Bestandteil (b) zwischen 0,5 bis 20 Millionen Zellen/ml Suspension, bevorzugt ist 1 bis 10 Millionen Zellen/ml, besonders bevorzugt 3 bis 6 Millionen Zellen/ml Suspension. Ein vorteilhaftes Zellmengenverhältnis der Bestandteile (a) zu (b) beträgt bei oberflächlichen Wunden 0,1:1 (a:b) bis 10:1 (a:b). Bevorzugt ist ein 30 Zellmengenverhältnis von 0,5:1 bis 5:1 (a:b), besonders bevorzugt ist ein Verhältnis von 1:1. Bei tieferen Wunden ist ein Zellmengenverhältnis bevorzugt, daß

einen Überschuß an Fibroblasten enthält, so daß ein besseres Auffüllen der profunden Wunde mit Granulationsmaterial ermöglicht wird. Der genaue jeweilige Ansatz der Suspensionskulturen hängt vom Einssatzzweck ab und liegt im Rahmen der Kenntnisse des Fachmanns auf dem Gebiet der Zellkultur (s. z.B. Hünyadi *et al.*, *J. Dermatol. Surg. Oncol.*, 1988, Vol. 14, Seiten 75-78; O'Connor und Mulliken, *Lancet*, 1981, Vol. 10, Seiten 75-78).

Die sowohl in Komponente (a) als auch (b) enthaltene Fibrinmatrix besteht in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung aus einem handelsüblichen und arzneimittelrechtlich zugelassenen Fibrinkleber, wie z.B. "Tissucol Duo S Immuno" der Firma Baxter. Im Gegensatz zu den aus dem Stand der Technik bekannten (präformierten) Transplantaten auf Kollagenbasis wirkt die erfindungsgemäße Fibrinmatrix der Zwei-Komponentenzusammensetzung fördernd auf die Migration, Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen (Clark *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* (1982), Vol. 79, Seiten 264- 269; Tuan *et al.*, *Exp. Cell. Res.* (1996), Vol. 223, Seiten 127-134; Ongena *et al.*, *Dermatol. Surg.* (2000), Vol. 26, Seiten 447- 451). Eine mögliche Erklärung für die o.g. Vorteile der erfindungsgemäßen Fibrinmatrix ist die Tatsache, daß die Anwesenheit von präformiertem Kollagen die Ausbildung weiterer dermaler Strukturen über einen *Feed-Back* Mechanismus hemmt (in der Art einer Produkthemmung), d.h. die Zellen erhalten bei Vorhandensein von Kollagen das Signal, die Proliferation herunterzuregulieren oder ganz einzustellen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Fibroblasten in 3D-Kollagengelen apoptotisch werden (Fluck *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, 1998, Vol. 110, Seiten 153-157). Derartige Effekte sind jedoch für ein frisch eingebrachtes Transplantat von großem Nachteil, da eine Zellmigration und Proliferation unbedingt erforderlich ist, um ein Verwachsen und Integrieren des Transplantates in die Wunde zu ermöglichen und eine intakte dermo-epidermale Junktionszone auszubilden, die für ein stabiles physiologisches Transplantat erforderlich ist. Die erfindungsgemäße Zwei-Komponenten Zusammensetzung beseitigt dieses Problem und induziert physiologisches Granulationsgewebe, was zu einem physiologisch angepassten

- 10 -

Matrixumbau durch die beteiligten Zelltypen selbst führt und somit eine verbesserte Textur des Unterhautgewebes sowie der dermo-epidermalen Junktionszone bewirkt. Da zur Wundheilung unter Verwendung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung lediglich jeweils ein dünner Film der Komponenten (a) und (b)

5 aufgetragen werden muß - in einer bevorzugten Ausführungsform findet flächen-deckende Benetzung des Wundareals statt -, verringert sich gegenüber Transplantaten des Standes der Technik die Diffusionsstrecke für Nährstoffe, angiogenetische Faktoren und andere regulatorisch aktive Substanzen. Demzufolge stellt die erfindungsgemäße Zusammensetzung ein Zwei-Komponentensystem bereit,

10 das die Transplantatqualität, dessen Lebensdauer und die physiologische Integration des transplantierten Gewebes gegenüber dem Stand der Technik deutlich verbessert.

Die vorliegende Erfindung betrifft des weiteren in einer bevorzugten Ausführungsform eine Zwei-Komponenten Zusammensetzung gemäß dem obigen Anspruch, bei der die Fibroblasten- und/oder die Keratinozytensuspension aus autologen Spenderzellen des zu behandelnden Patienten gewonnen wurden. Zu diesem Zweck wird dem Patienten zunächst ein ca. 1 bis 2 cm² großes Vollhautbiopsat entnommen, das anschließend in einer vorteilhaften Ausführungsform 2 bis 28

20 Tage in Kultur genommen wird, wobei 4 bis 21 Tage bevorzugt und 14 bis 18 Tage besonders bevorzugt ist. Mit 1 ml autologer thrombinhaltiger Keratinozyten-(b) bzw. Fibroblastenlösung (a), die in einer besonders bevorzugten Ausführungsform 500 i.E. humanes Thrombin enthalten, oder, in einer bevorzugten Ausführungsform, in Fibrinogenlösung vorliegen und beim Einbringen in das Empfängerareal mit Thrombin/Calciumchloridlösung gemischt werden.

25

Die Komponenten (a) und (b), die in einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung 3 bis 6 x 10⁶ Zellen umfassen, lassen bei oberflächlichen Defekten die Transplantation von ca. 100 cm² Wundfläche zu. Sind

30 tiefere Wunden zu transplantieren, so ist ein größeres Mengenverhältnis von

Fibroblasten zu Keratinozyten vorteilhaft, wobei das genaue Verhältnis von der Tiefe der Wunde abhängt und im Einzelfall vom Transplanteur festgelegt werden muß.

5 Die vorliegende Erfindung betrifft in einer bevorzugten Ausführungsform ferner eine Zusammensetzung, bei der die verwendeten Fibroblasten- und Keratinozytensuspensionen im wesentlichen kollagenfrei sind. Dabei bedeutet "im wesentlichen kollagenfrei", dass kein Kollagen zugesetzt wird und bereits vorhandenes Kollagen durch Behandlung mit Kollagenase entfernt wird. In einer vorteilhaften
10 Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der Kollagengehalt der verwendeten Zellsuspensionen des Zwei-Komponentensystems (a und b) auf 40 bis 60% der ursprünglich in der Suspensionskultur vorhandenen Ausgangsmenge reduziert, in einer bevorzugten Ausführungsform wird der Kollagengehalt auf 20 bis 40% der Ausgangsmenge reduziert; besonders bevorzugt ist eine Reduktion
15 des Kollagengehaltes auf unter 20% der Ausgangsmenge. Allgemein gilt, daß ein besonders niedriger Kollagengehalt (unter 20% der Ausgangsmenge) sich besonders vorteilhaft auf die physiologische Integration des Transplantates auswirkt.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft
20 eine Zusammensetzung, bei der die verwendeten Fibroblasten- und/oder Keratinozytensuspensionen subkonfluent in Suspensionskultur vorliegen. Die verwendeten Suspensionskulturen enthalten - im Gegensatz zu Transplantaten des Standes der Technik, die auf konfluenten, präformierten Kulturen basieren - Zellen, die nicht kontaktinhibiert sind und die somit ein erhöhtes Migrations- und Proliferationspotential besitzen. Demzufolge stellen subkonfluent wachsende Fibroblasten bzw. Keratinozyten eine an das erfindungsgemäße Zwei-Komponenten Zusammensetzung angepasste Form der Kultur dar, die im Gegensatz zu präformierten Transplantaten eine biochemische und morphologische Anpassung des Transplantats an die Wunde ermöglicht, da die darin enthaltenen
25 Zellen noch nicht vollständig ausdifferenziert sind. Demgemäß dient in einer be-
30

- 12 -

vorzugten Ausführungsform Komponente a der erfindungsgemäßen Zusammensetzung zum flexiblen "aufgranulieren" profunder Wunden und Komponente b zum Abschluss bzw. zur Epithelbildung auf der Wundoberfläche.

- 5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung, bei der die Fibroblasten- und/oder die Keratinozytensuspension einen Fibrinkleber als Matrix enthält. In einer vorteilhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden handelsübliche Fibrinkleber verwendet, die arzneimittelrechtlich zugelassen sind, wie z.B. das Produkt "Tissucol
- 10 Duo S Immuno" der Firma Baxter.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden kryokonservierte Zellen eingesetzt. Die Kryokonservierung dient dem Aufbewahren gewonnener Spenderzellen bzw. Zellen aus dem Spenderareal des Patienten, die
15 nicht unmittelbar, sondern zu einem späteren Zeitpunkt transplantiert werden sollen. Die Kryokonservierung kann durchgeführt werden vor oder bei Erreichen der Subkonfluenz der jeweiligen Zellsuspension der Komponente (a) bzw. (b).

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung, die ein von
20 bovinem Serum freies Medium umfasst. Die Verwendung von Medien ohne bovinen Serum stellt insoweit einen Vorteil dar, als das Infektionsrisiko, beispielsweise mit BSE bzw. der neuen Form der Creutzfeld-Jacob Krankheit, das nach derzeitigem Stand der Forschung nicht auszuschließen ist, minimiert wird. Verwendung finden stattdessen, wie bereits oben ausgeführt, bereits seit langer Zeit auf
25 dem Markt etablierte Fibrinkleber bzw. -matrices. Des weiteren ist der bevorzugte Fibrinkleber frei von bovinem Kollagen.

Ferner können die in der erfindungsgemäßen Zusammensetzung eingesetzten Fibroblasten- und Keratinozytensuspensionen gentechnisch modifizierte Zellen umfassen. Vorteilhaft sind in diesem Zusammenhang Zellen, in die mittels dem Fachmann bekannter Verfahren Gene bzw. Vektoren eingeschleust werden, die 5 beispielsweise für chemotaktische und angiogenetische Faktoren, Hormone, Peptide oder Strukturproteine kodieren und somit den transplantierten Zellen wünschenswerte Eigenschaften verleihen können.

Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung in einer bevorzugten Ausführungsform die Verwendung einer Zusammensetzung der hier in Rede stehenden Art zur Behandlung von chronischen Ulzera unterschiedlicher Genese, sowie zur Behandlung von Verbrennungswunden, posttraumatischen und postoperativen Wunddefekten nach Exzision, Dermabrasion und Laserablation, sowie von nävoi-10 den Hautveränderungen und Narben nach Dermabrasion.

15 Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung in der Art, dass die Fibroblastensuspension (Komponente a) vor der Keratinozytensuspension (Komponente b) in die Wunde gebracht wird. In einer vorteilhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird Komponente b wenige Sekunden bis Minuten nach der Komponente a) in die Wunde ge-20 bracht, in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform beträgt dieser Zeitraum Minuten bis mehrere Stunden, besonders bevorzugt sind Zeiträume von mehrere Tagen. Für beide Komponenten a und b gilt, dass die Suspensionen, die zunächst Fibrinogen und die jeweiligen Zellen umfassen, unmittelbar bei der Applikation in die Wunde in einer bevorzugten Ausführungsform mit der Thrombin und Calci-25 umchlorid enthaltenden Lösung gemischt werden, so dass die Polymerisation der Fibrinmatrix *in situ* stattfinden kann. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung liegen die Zellen (Komponenten a und b) in Thrombin/Calciumchloridlösung vor und werden bei oder unmittelbar vor der Applikation in der Wunde erst zur endgültigen Zwei-Komponenten Zusamme-30 setzung mit Fibrinogenlösung gemischt (mittels einer Zwillingspritze).

- 14 -

Des weiteren betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung, wobei die Fibroblastensuspension gemäß a) und/oder die Keratinozytensuspension gemäß b) vor der Verwendung mit einer Thrombinlösung gemischt werden. Für dieses Verfahren sind die für den oben
5 genannten Verwendungsanspruch aufgeführten Zeitabstände bezüglich der Zugabe der Komponente (a) bzw. (b) bevorzugt.

Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung, wobei eine Thrombin enthaltende Fibroblastensuspension
10 gemäß (a) und/oder eine Thrombin enthaltende Keratinozytensuspension gemäß (b) vor der Verwendung mit einer Fibrinogenlösung gemischt werden. Auch für dieses Verfahren sind die für den oben genannten Verwendungsanspruch aufgeführten Zeitabstände bezüglich der Zugabe der Komponente (a) bzw. (b) bevorzugt.

15

Ferner können im Rahmen dieses Herstellungsverfahrens die Fibroblastensuspension und/oder die Keratinozytensuspension vor der Herstellung der Komponenten (a) und (b) mit Kollagenase behandelt werden. Dies bedeutet, dass in den Zellsuspensionen bzw. -kulturen vorhandenes Kollagen durch Behandlung mit Kollagenase entfernt wird. In einer vorteilhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der Kollagengehalt der verwendeten Zellsuspensionen des Zweikomponentensystems (a und b) auf 40 bis 60% der ursprünglich in der Suspensionskultur vorhandenen Ausgangsmenge reduziert, in einer weiter bevorzugten Ausführungsform wird der Kollagengehalt auf 20 bis 40% der Ausgangsmenge
20 reduziert; besonders bevorzugt ist eine Reduktion des Kollagengehaltes auf unter 20% der Ausgangsmenge. Allgemein gilt, wie bereits oben erwähnt, daß sich ein besonders niedriger Kollagengehalt (unter 20% der Ausgangsmenge) vorteilhaft auf die physiologische Integration des Transplantates in die zu therapierende Wunde bzw. Läsion auswirkt.
25

- 15 -

Ferner ist im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens eine Kultivierung Fibroblastensuspension gemäß (a) und/oder der Keratinozytensuspension gemäß (b) unter Hypoxie möglich. Hartmann *et al.* fanden bereits 1997 bzw. 1999, dass 5 unter Hypoxie kultivierte Zellen (hier: Endothelzellen bzw. Tumorzellen) eine Hochregulierung des Angiogeninspiegels aufwiesen (Hartmann *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* 1997, Vol. 109, Seite 438; Hartmann *et al.*, *Cancer Res.*, 1999, Vol. 59, Seiten 1578-1583). Im Falle der Tumorzellen wird so sichergestellt, dass die für die Versorgung und das Wachstum des Tumors unabdingbare verstärkte Angio- 10 genese induziert wird. Diesen Effekt nutzt die vorliegende Erfindung, da das Schicksal des transplantierten Gewebes in besonderem Maße von einer schnellen Vaskularisierung des Wundareals abhängt. Somit führt die temporäre Hypoxie einer oder beider zu transplantierender Komponenten des Zwei-Komponenten Systems dazu, dass diese Zellen verstärkt angiogenetische Faktoren sezernieren 15 und damit eine Vaskularisierung des Wundareals fördern. Die durch die Hypoxie initiierte Vaskularisierung stellt somit eine Anpassung des Gewebes bzw. der Zellen an eventuell auftretende Sauerstoffmangelzustände dar.

Ferner können der Fibroblastensuspension (Komponente a) und/oder der Kerati- 20 nozytensuspension (Komponente b) angiogenetische Faktoren zugesetzt werden. Auch diese bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung basiert auf dem Gedanken, dass eine möglichst schnelle Vaskularisierung des transplantierten Areals wünschenswert und vorteilhaft ist. Als angiogenetische Faktoren kommen z.B. VEGF, Angiogenin und verwandte Peptidfaktoren in Frage. Die erforderliche 25 Dosierung und Applikation dieser Faktoren kann vom Fachmann routinemäßig auf die jeweilige Anwendung abgestimmt werden.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung ein Zelltransplantat, erhältlich durch ein Verfahren wie vorstehend beschrieben.

Gemäß den voranstehend gemachten Ausführungen ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung gelungen, eine Zwei-Komponenten Zusammensetzung zur Behandlung von Hautdefekten, Ulzera und Wunden bereitzustellen, die - im Gegensatz zu den präformierten Systemen des Standes der Technik - eine Transplantation von Fibroblasten und Keratinozyten erlaubt, die eine *in situ* Anpassung der subkonfluenten Zellen an das umgebende Wundgewebe erlaubt und sowohl die beschleunigte Bildung von Granulationsgewebe in der Wunde, als auch eine rasche Epithelbildung induziert. Somit können mit den vorliegenden Zusammensetzungen bzw. Verfahren zu deren Herstellung erstmals auch profunde Wunden
5 transplantiert werden, ohne dass auf die körpereigene Granulation der Wunde gewartet werden muß. Die weiteren Nachteile der herkömmlichen Transplantate wie mechanische Instabilität und Infektionsgefahr werden ebenfalls beseitigt bzw.
10 vermindert.

15 Die vorliegende Erfindung soll abschließend in Form eines Beispiels erläutert werden.

Beispiel:

20 Eine dem Patienten entnommene Hautbiopsie wird nach Desinfektion in eine sterile Umgebung gebracht, in der die Bedingungen nach Reinheitsklasse A gemäß GMP-Richtlinien herrschen. Dies geschieht beispielsweise durch Übertragung der Probe in einen Arbeitsisolator mittels eines Transferisolators, wobei jeweils nahezu vollständige Keimfreiheit herrscht.

25 Zur Herstellung der Zellsuspensionen bzw. -kulturen für die Komponenten a und b werden folgende Schritte, vorzugsweise unter den in Klammern angegebenen Reinheitsbedingungen gemäß GMP-Standard, durchgeführt:

30 - Präparation der Hautbiopsie, mechanische Entfernung von Dermisresten (A)

- 17 -

- Spülung mit 70%-igem Ethanol und dann mit PBS-Puffer (A)
- Enzymatischer Verdau zur Ablösung der Epidermis von der Dermis (mindestens 2,4 U/ml Dispase, entweder 4 Stunden bei 37°C oder über Nacht bei 4°C) (D)
- Trennung der Epidermis von der Dermis durch "Abziehen" (A)
- 5 - Zerkleinerung der Epidermis in einer PBS-Pufferlösung mittels sterilen Instrumente, beispielsweise Scheren oder Pinzetten (A)
- Enzymatische Dissoziation einzelner Zellen durch Trypsinierung (0,5%-ige Trypsinlösung; 30 Minuten bei 37°C) (A oder D)
- Stoppen der Trypsinierung, beispielsweise durch Zugabe von Serum (A)
- 10 - Zentrifugation (zwischen 1500 und 4000 upm; bei Raumtemperatur; etwa 5 bis 10 Minuten) (D)
- Absaugen des Überstandes und Resuspension der Zellen in einem geeigneten Keratinozyten- bzw. Fibroblastennährmedium (z.B. in MEM- oder RPMI-Medium) (A)
- 15 - Aussäen der Zellen in Kulturflaschen (5000 – 50000 Zellen/cm²) (A)
- Kultivierung der Zellen bis zur Subkonfluenz (37°C, 5% CO₂, Mediumwechsel nach Bedarf, in der Regel jeden zweiten oder dritten Tag) (D)

Die Herstellung einer autologen Keratinozyten- (b) bzw. Fibroblastensuspension (a)
20 der Zwei- Komponenten Zusammensetzung geschieht dann folgendermaßen:

- Enzymatische Dissoziation einzelner Zellen durch Trypsinierung (0,5%-ige Trypsinlösung; 30 Minuten bei 37°C) (A oder D)
- Stoppen der Trypsinierung, beispielsweise durch Zugabe von Serum (A)
- 25 - Zentrifugation (zwischen 1500 und 4000 upm; bei Raumtemperatur; etwa 5 bis 10 Minuten) (D)
- Resuspension der Zellen und Aufnahme der Zellen in Thrombin/Calciumchlorid- oder Fibrinogenlösung (4 Mio Zellen / 0,5 ml (A)).
- 30 Nicht in Thrombinlösung aufgenommene Zellen werden entweder sofort oder nach erneuter Weiterkultivierung bis zur Subkonfluenz kryokonserviert.

- 18 -

Vor der Auftragung der Zwei-Komponenten Zusammensetzung wird das Wundareal gereinigt und vorbereitet, z.B. durch Dermabrasion. Auf die entsprechenden Stellen wird zunächst die Suspension der autologen kultivierten Fibroblasten in Thrombin/Calciumchloridlösung aufgetragen (Komponente a), wobei die Verwendung einer Zwillingspritze vorteilhaft ist, bei der eine Kammer die zu transplantierenden Fibroblasten in Thrombin/Calciumchloridlösung enthält und die andere Kammer Fibrinogenlösung, so dass eine Mischung der Zellen in Thrombin/Calciumchloridlösung mit Fibrinogen *in situ* stattfindet. Hierbei ist zu beachten, dass die Bildungsgeschwindigkeit des Fibrins aus Fibrinogen und damit die Gerinnung über die Thrombinkonzentration steuerbar ist und somit vom Fachmann die gewünschte Gerinnungszeit eingestellt werden kann.

Anschließend wird entweder direkt nach dem Auftragen der Komponente (a), bzw. einige Stunden oder Tage später (bezügl. der bevorzugten Zeiträumen s.o., Beschreibung) die Lösung (b), also Keratinozyten in Thrombin/Calciumchloridlösung aufgetragen, wobei sich ebenfalls in der zweiten Kammer einer Zwillingspritze Fibrinogenlösung befindet und eine Mischung der Fibrinogenlösung mit den Zellen in Thrombin/Calciumchloridlösung unmittelbar vor oder bei der Applikation in das Empfängerareal stattfindet.

20

Nun befindet sich die vollständige Zwei-Komponenten Zusammensetzung im Empfängerareal, so dass eine physiologisch und morphologisch angepasste Regeneration des betroffenen Bereiches stattfinden kann.

Patentansprüche

1. Zwei-Komponenten Zusammensetzung zur Behandlung von Hautdefekten, Ulzera, und Wunden umfassend die folgenden Komponenten:
 - 5 a) Eine Fibroblastensuspension enthaltend Fibrin bzw. Fibrinogen als Matrix (Komponente a); und
 - b) eine Keratinozytensuspension enthaltend Fibrin bzw. Fibrinogen als Matrix (Komponente b).
- 10 2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, bei der die Fibroblasten- oder die Keratinozytensuspension oder die Fibroblasten- und die Keratinozyten-suspension aus autologen Spenderzellen des zu behandelnden Patienten gewonnen wurden.
- 15 3. Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, bei der die verwendeten Fibroblasten- und Keratinozytensuspensionen im wesentlichen kollagen-frei sind.
- 20 4. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei der die verwen-deten Fibroblasten- oder Keratinozytensuspensionen oder die Fibroblasten- und Keratinozytensuspensionen subkonfluent in Suspensionskultur vorlie-gen.
- 25 5. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, bei der die Fibroblasten- und die Keratinozytensuspension einen Fibrinkleber als Mat-rix enthält.

- 20 -

6. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, die kryokonservierte Zellen umfaßt.
7. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, umfassend ein Medium frei von bovinem Serum.
8. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, bei der die Fibroblasten- oder Keratinozytensuspensionen oder die Fibroblasten- und Keratinozytensuspensionen gentechnisch modifizierte Zellen umfassen.
10
9. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Behandlung von chronischen Ulzera unterschiedlicher Genese, zur Behandlung von Verbrennungswunden, von posttraumatischen Wunddefekten, von postoperativen Wunddefekten nach Dermabrasion, Exzision oder
15 Laserablation von Hautveränderungen oder zur Behandlung von nävoiden Hautveränderungen und von Narben nach Dermabrasion.
10. Verwendung nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Fibroblastensuspension gemäß (a) vor der Keratinozytensuspension gemäß
20 (b) in die Wunde gebracht wird.
11. Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Fibroblastensuspension gemäß (a) oder die Keratinozytensuspension gemäß (b) oder die Fibroblastensuspension gemäß (a) und die Keratinozytensuspension gemäß
25 (b) vor der Verwendung mit einer Thrombinlösung gemischt werden.

- 21 -

12. Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine Thrombin enthaltende Fibroblastensuspension gemäß (a) oder eine Thrombin enthaltende Keratinozytensuspension gemäß (b) oder eine Thrombin enthaltende Fibroblastensuspension gemäß (a) und eine Thrombin enthaltende Keratinozytensuspension gemäß (b) vor der Verwendung mit einer Fibrinogenlösung gemischt werden.
5
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Fibroblastensuspension gemäß (a) oder die Keratinozytensuspension gemäß (b) oder die Fibroblastensuspension gemäß (a) und die Keratinozytensuspension gemäß (b) vor dem Mischen mit Thrombin oder Fibrinogen mit Kollagenase behandelt werden.
10
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Fibroblastensuspension gemäß (a) oder die Keratinozytensuspension gemäß (b) oder die Fibroblastensuspension gemäß (a) und die Keratinozytensuspension gemäß (b) unter Hypoxie kultiviert werden.
15
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Fibroblastensuspension gemäß (a) oder der Keratinozytensuspension gemäß (b) oder der Fibroblastensuspension gemäß (a) und der Keratinozytensuspension gemäß (b) angiogenetische Faktoren zugesetzt werden.
20
16. Zelltransplantat, erhältlich durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 11 bis 15.
25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/EP 02/03640

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K35/12 C12N5/08 C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

MEDLINE, EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 32207 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 8 June 2000 (2000-06-08) page 5, line 26 -page 9, line 21; claims 1,7-9,12; examples 1-3 — LAM P K ET AL: "Dermal fibroblasts do not enhance the graft take rate of autologous, cultured keratinocyte suspension on full-thickness wounds in rats." ANNALS OF PLASTIC SURGERY. UNITED STATES FEB 2001, vol. 46, no. 2, February 2001 (2001-02), pages 146-149, XP001085443 ISSN: 0148-7043 the whole document — —/—	1,2,4-9, 11,12,16
X		1-5,9, 11,12

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 July 2002

Date of mailing of the international search report

18/07/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rutz, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No

PCT/EP 02/03640

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ROSENTHAL F M ET AL: "Paracrine stimulation of keratinocytes in vitro and continuous delivery of epidermal growth factor to wounds in vivo by genetically modified fibroblasts transfected with a novel chimeric construct." IN VIVO (ATHENS, GREECE) GREECE 1997 MAY-JUN, vol. 11, no. 3, May 1997 (1997-05), pages 201-208, XP002075251 ISSN: 0258-851X the whole document page 207, right-hand column, line 4 - line 10	1-9
Y	HORCH RAYMUND E ET AL: "Single-cell suspensions of cultured human keratinocytes in fibrin-glue reconstitute the epidermis." CELL TRANSPLANTATION, vol. 7, no. 3, May 1998 (1998-05), pages 309-317, XP002204016 ISSN: 0963-6897 abstract page 314, right-hand column, paragraph 2 -page 316, left-hand column, paragraph 3	1-16
Y	STARK G B ET AL: "Biological wound tissue glue systems in wound healing!" LANGENBECKS ARCHIV FUR CHIRURGIE. SUPPLEMENT. KONGRESSBAND. DEUTSCHE GESELLSCHAFT FUR CHIRURGIE. KONGRESS. GERMANY 1998, vol. 115, 1998, pages 683-688, XP001085344 ISSN: 0942-2854 abstract page 687, line 6 -page 688, line 16	1-16
A	MEANA A ET AL: "Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels." BURNS, vol. 24, no. 7, November 1998 (1998-11), pages 621-630, XP002204017 ISSN: 0305-4179 the whole document	1-16
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/EP 02/03640

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PELLEGRINI G ET AL: "CULTIVATION OF HUMAN KERATINOCYTE STEM CELLS: CURRENT AND FUTURE CLINICAL APPLICATIONS" MEDICAL AND BIOLOGICAL ENGINEERING AND COMPUTING, PETER PEREGRINUS LTD. STEVENAGE, GB, vol. 36, no. 6, 1 November 1998 (1998-11-01), pages 778-790, XP000784853 ISSN: 0140-0118 the whole document ----	1-16
A	CHAN ERIC S Y ET AL: "A new technique to resurface wounds with composite biocompatible epidermal graft and artificial skin." JOURNAL OF TRAUMA INJURY INFECTION AND CRITICAL CARE, vol. 50, no. 2, February 2001 (2001-02), pages 358-362, XP001085434 ISSN: 1079-6061 the whole document ----	1-16
A	HANSBROUGH J F ET AL: "BURN WOUND CLOSURE WITH CULTURED AUTOLOGOUS KERATINOCYTES AND FIBROBLASTS ATTACHED TO A COLLAGEN GLYCOSAMINOGLYCAN SUBSTRATE" JAMA (JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION), vol. 262, no. 15, 1989, pages 2125-2130, XP000971590 ISSN: 0098-7484 the whole document ----	1-16
A	WO 00 25583 A (UNIV NEW YORK) 11 May 2000 (2000-05-11) the whole document ----	8
P,X	US 2001/006813 A1 (SEUBERT RAINER ET AL) 5 July 2001 (2001-07-05) the whole document ----	1-16
P,X	EP 1 184 040 A (SURFACE CARE GMBH) 6 March 2002 (2002-03-06) the whole document -----	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP02/03640**Box I.1**

Although Claims 9 and 10 relate to a method for treating a human or animal body, the search has nevertheless been carried out on the basis of the stated effects of the compound or composition.

Claims 9 and 10

PCT Rule 39.1(iv) – method for treatment of the human or animal body by therapy.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/03640

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 0032207	A	08-06-2000	AU EP NO WO	1840200 A 1143983 A1 20012695 A 0032207 A1		19-06-2000 17-10-2001 03-07-2001 08-06-2000
WO 0025583	A	11-05-2000	US AU WO	6268215 B1 1519600 A 0025583 A1		31-07-2001 22-05-2000 11-05-2000
US 2001006813	A1	05-07-2001	DE AU WO	19958693 A1 3155701 A 0140444 A2		28-06-2001 12-06-2001 07-06-2001
EP 1184040	A	06-03-2002	DE EP	10041468 C1 1184040 A1		07-03-2002 06-03-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In
Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/03640

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K35/12 C12N5/08 C12N5/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

MEDLINE, EPO-Internal, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	WO 00 32207 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 8. Juni 2000 (2000-06-08) Seite 5, Zeile 26 -Seite 9, Zeile 21; Ansprüche 1,7-9,12; Beispiele 1-3	1,2,4-9, 11,12,16
X	LAM P K ET AL: "Dermal fibroblasts do not enhance the graft take rate of autologous, cultured keratinocyte suspension on full-thickness wounds in rats." ANNALS OF PLASTIC SURGERY. UNITED STATES FEB 2001, Bd. 46, Nr. 2, Februar 2001 (2001-02), Seiten 146-149, XP001085443 ISSN: 0148-7043 das ganze Dokument	1-5,9, 11,12

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts
1. Juli 2002	18/07/2002
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Rutz, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In	nales Aktenzeichen
PCT/EP 02/03640	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ROSENTHAL F M ET AL: "Paracrine stimulation of keratinocytes in vitro and continuous delivery of epidermal growth factor to wounds in vivo by genetically modified fibroblasts transfected with a novel chimeric construct." IN VIVO (ATHENS, GREECE) GREECE 1997 MAY-JUN, Bd. 11, Nr. 3, Mai 1997 (1997-05), Seiten 201-208, XP002075251 ISSN: 0258-851X das ganze Dokument Seite 207, rechte Spalte, Zeile 4 – Zeile 10 ---	1-9
Y	HORCH RAYMUND E ET AL: "Single-cell suspensions of cultured human keratinocytes in fibrin-glue reconstitute the epidermis." CELL TRANSPLANTATION, Bd. 7, Nr. 3, Mai 1998 (1998-05), Seiten 309-317, XP002204016 ISSN: 0963-6897 Zusammenfassung Seite 314, rechte Spalte, Absatz 2 –Seite 316, linke Spalte, Absatz 3 ---	1-16
Y	STARK G B ET AL: "Biological wound tissue glue systems in wound healing!" LANGENBECKS ARCHIV FÜR CHIRURGIE. SUPPLEMENT. KONGRESSBAND. DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR CHIRURGIE. KONGRESS. GERMANY 1998, Bd. 115, 1998, Seiten 683-688, XP001085344 ISSN: 0942-2854 Zusammenfassung Seite 687, Zeile 6 –Seite 688, Zeile 16 ---	1-16
A	MEANA A ET AL: "Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels." BURNS, Bd. 24, Nr. 7, November 1998 (1998-11), Seiten 621-630, XP002204017 ISSN: 0305-4179 das ganze Dokument ---	1-16
	-/--	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intl. onales Aktenzeichen
PCT/EP 02/03640

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	PELLEGRINI G ET AL: "CULTIVATION OF HUMAN KERATINOCYTE STEM CELLS: CURRENT AND FUTURE CLINICAL APPLICATIONS" MEDICAL AND BIOLOGICAL ENGINEERING AND COMPUTING, PETER PEREGRINUS LTD. STEVENAGE, GB, Bd. 36, Nr. 6, 1. November 1998 (1998-11-01), Seiten 778-790, XP000784853 ISSN: 0140-0118 das ganze Dokument	1-16
A	CHAN ERIC S Y ET AL: "A new technique to resurface wounds with composite biocompatible epidermal graft and artificial skin." JOURNAL OF TRAUMA INJURY INFECTION AND CRITICAL CARE, Bd. 50, Nr. 2, Februar 2001 (2001-02), Seiten 358-362, XP001085434 ISSN: 1079-6061 das ganze Dokument	1-16
A	HANSBROUGH J F ET AL: "BURN WOUND CLOSURE WITH CULTURED AUTOLOGOUS KERATINOCYTES AND FIBROBLASTS ATTACHED TO A COLLAGEN GLYCOSAMINOGLYCAN SUBSTRATE" JAMA (JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION), Bd. 262, Nr. 15, 1989, Seiten 2125-2130, XP000971590 ISSN: 0098-7484 das ganze Dokument	1-16
A	WO 00 25583 A (UNIV NEW YORK) 11. Mai 2000 (2000-05-11) das ganze Dokument	8
P,X	US 2001/006813 A1 (SEUBERT RAINER ET AL) 5. Juli 2001 (2001-07-05) das ganze Dokument	1-16
P,X	EP 1 184 040 A (SURFACE CARE GMBH) 6. März 2002 (2002-03-06) das ganze Dokument	1-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/03640

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. 9, 10
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese Internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der Internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
<p>Fortsetzung von Feld I.1</p> <p>Obwohl die Ansprüche 9 und 10 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.</p> <hr/> <p>Fortsetzung von Feld I.1</p> <p>Ansprüche Nr.: 9,10</p> <p>Regel 39.1(iv) PCT - Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inte
ales Aktenzeichen

PCT/EP 02/03640

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0032207	A	08-06-2000	AU EP NO WO	1840200 A 1143983 A1 20012695 A 0032207 A1	19-06-2000 17-10-2001 03-07-2001 08-06-2000
WO 0025583	A	11-05-2000	US AU WO	6268215 B1 1519600 A 0025583 A1	31-07-2001 22-05-2000 11-05-2000
US 2001006813	A1	05-07-2001	DE AU WO	19958693 A1 3155701 A 0140444 A2	28-06-2001 12-06-2001 07-06-2001
EP 1184040	A	06-03-2002	DE EP	10041468 C1 1184040 A1	07-03-2002 06-03-2002